

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

37

METHOD FOR LYOPHILIZING SUPEROXIDE DISMUTASE-RETAINING LIPOSOME PHARMACEUTICAL

B2

Patent number: JP1106829  
Publication date: 19970722  
Inventor: NAGATA YOSHIIKO, others: 02  
Applicant: TOSOH CORP.  
Classification:  
International: A61K37/52, A61K9/50  
European:  
Application number: JP19870254010, 19871021  
Priority number(s):

Abstract of JP1106829

**PURPOSE:** To obtain the titled pharmaceutical having excellent solubility in using, maintaining particle size distribution of liposome particle also after dissolving and free from change of including ratio of superoxide dimutase (SOD), by dispersing SOD retaining liposome pharmaceutical containing stearyl amine as membrane material and saccharides into an aqueous medium and lyophilizing the dispersion.  
**CONSTITUTION:** A superoxide dimutase (SOD)-retaining liposome pharmaceutical consisting of a liposome membrane material obtained by adding 0.1-0.8pts.wt. stearyl amine to 1pts.wt. phospholipid and saccharides selected from grape sugar, sugar and trehalose are dispersed into an aqueous medium (e.g., water or physiological saline) and lyophilized e.g., at -20-50 deg.C and then dried under reduced pressure of  $\leq 0.1$  Torr. The saccharides and aqueous medium are each preferably used in amounts of 1-10pts.wt. and 3-5pts.wt. based on 1pts.wt. phospholipid of the liposome pharmaceutical.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑤ Int. Cl.

A 61 K 37/52  
9/10

識別記号

3 2 7

庁内整理番号

8615-4C

③ 公開 平成1年(1989)4月24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

④ 発明の名称 スーパーオキシドジススターゼ保持リボソーム製剤の凍結乾燥法

⑪ 特 願 昭62-264010

⑫ 出 願 昭62(1987)10月21日

⑬ 発 明 者 永 田 喜 彦 神奈川県相模原市南台1-9-1-203

⑭ 発 明 者 橋 本 雅 文 神奈川県横浜市緑区桜台35-21

⑮ 発 明 者 嶋 津 和 博 神奈川県横浜市緑区桜台35-21

⑯ 出 願 人 東 ソ ー 株 式 会 社 山口県新南陽市大字富田4560番地

## 明 細 書

## 1 発明の名称

スーパーオキシドジススターゼ保持リボソーム製剤の凍結乾燥法

## 2 特許請求の範囲

- (i) ステアリルアミンをリボソーム膜材として含有するスーパーオキシドジススターゼ保持リボソーム製剤と、ブドウ糖、ショ糖及びトレハロースから選ばれる少なくとも1種類以上の糖類とを水性媒体に分散させた後に凍結乾燥することを特徴とするスーパーオキシドジススターゼ保持リボソーム製剤の凍結乾燥法。

## 3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、凍結乾燥したスーパーオキシドジススターゼ(以後、SODと略す)保持リボソーム製剤の製造法に関するものである。本発明により製造されるSOD保持リボソーム製剤は、注射剤等に利用される。

(従来の技術及びその問題点)

リボソームは、内設に水層を有する脂質二分子膜から成る閉鎖小胞であり、生体膜モデルとしてのみならず、薬剤、酵素、遺伝子等を封入可能な運搬体(キャリアー、担体)としての医用リボソームの開発研究が、活発に行なわれている。

また、SODは活性酸素を捕捉除去する作用を持ち、活性酸素が病因と考えられる疾病の治療、例えば抗リウマチ剤としてや放射線療法による細胞障害防止、制癌剤や化学療法剤の副作用防止、さらには腸管潰瘍(ペーチェット病、クローン氏病等)や川崎病などの難病疾患の治療に有効な薬剤として注目を集めている。

このSODをリボソームに保持させたSOD保持リボソーム製剤は、従来のフリーSOD製剤(リボソームに保持されていないSOD製剤)に比較し、組織浸透性が迅速な点や組織特異性が高

い点で生体に対する親和性や生体内（血中）安定性が良好で抗菌作用の減弱を伴わず、安全で除放性に優れている。しかし、このリボソーム製剤は、水性媒体中における保存安定性に乏しいために、医薬品として実用に供することができなかった。

そこで、リボソーム製造の保存安定性を高めるために、水性媒体中のリボソーム製剤を凍結乾燥する方法が用いられてきた。凍結乾燥法とは、水性媒体に分散させたリボソーム製剤を瞬間的に凍結し、続いて低温にて水分を昇華乾燥させる方法で、用時には再び水性媒体に分散させてリボソーム製剤とすることができる。さらに凍結前の水性媒体にブドウ糖、ソルビトール等の糖類を添加した後、凍結乾燥してもよい旨が例えば特開昭57-82310号公報に開示されている。

しかしながら、80Dを保持したリボソーム製剤を分散させた水性媒体を従来法により凍結乾燥すると、凍結乾燥前後でリボソーム粒子の粒子径分布の著しい変化が起こったり、高価な80Dの保持率が大幅に低下し、遊離の80Dが増加する

好ましくは医薬品としての純度にまで精製されたものがよい。

一方、80Dを保持するリボソーム膜材としては、合成リン脂質、卵黄、大豆等の天然由来のリン脂質又はこれらの混合物を用いることができる。例えば、ジミリストイルホスファチジルコリン、ジステアリルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、卵黄や大豆由来のホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン等やこれらの水素添加物又はこれらの混合物を挙げることができるが、好ましくはホスファチジルコリンであり、さらに好ましくはジパルミトイルホスファチジルコリンである。さらにこれらのリボソーム膜材に対し、膜強化の目的でコレステロールや酸化防止剤として $\alpha$ -トコフェノール等を添加してもよく、この場合、添加量はリン脂質1重量部に対し、それぞれ0.1重量部程度が適当である。

本発明のリボソーム膜材は、ステアリルアミン

等の問題があり、実際の使用に耐えられる凍結乾燥品を得ることはできなかった。

（問題点を解決するための手段）

本発明は以上の観点からなされたもので、用時溶解性に優れ、溶解後も凍結乾燥前のリボソーム粒子の粒径分布を維持し、80Dの封入率が低下しない、凍結乾燥した80D保持リボソーム製剤の製造法を提供するものである。

即ち、本発明は、ステアリルアミンをリボソーム膜材として含有する80D保持リボソーム製剤及び、ブドウ糖、ショ糖及びトレハロースから選ばれる少なくとも1種類以上の糖類を水性媒体に分散させた後に、凍結乾燥することを特徴とする80D保持リボソーム製剤の凍結乾燥法に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる80Dとしては、特に限定はされず、例えば大腸菌、酵母、動物由来のものが用いられるが、牛又は人由来のものが好ましい。それらは赤血球、肝臓等から抽出によって、或いは遺伝子工学による生成物として得ることができ、

を含有することを必須とする。添加量としては、リン脂質1重量部に対し、0.1～0.8重量部が好ましい。

ステアリルアミンを含有するリボソーム膜材に80Dを保持させたリボソーム製剤の製造方法は種々あるが、例えばリボソーム膜材、ステアリルアミン、所望によってはコレステロールや $\alpha$ -トコフェノールをクロロホルム等の適当な有機溶媒に溶解した後、その溶媒を留去する。このリボソーム脂質混合物に対し、相転移温度以上で80Dを含有しない適当な緩衝液のみを加え、振盪又は超音波処理を施して良好な水和懸濁液を調製する。そこへ80D単体もしくは同一の緩衝液に溶解させた80D溶液を添加し、再び振盪する。続いて段階的に温度を下げながら各段階で適当な強度、時間で超音波照射を行うことにより、本発明のステアリルアミンをリボソーム膜材として含有する80D保持リボソーム製剤を得ることができる。なお80Dの添加量には、特に制限はなく、用途によって種々変更可能なものであるが、好ましく

はリン脂質1重量部に対し、80Dを0.2~0.5重量部用いる。又、緩衝液としては1~2.5 mM リン酸塩緩衝液が好ましい。

本発明において、80D保持リボソーム製剤と共に水性媒体に分散させる糖類としては、ブドウ糖、ショ糖及びトレハロース又は、これらの混合物である。リボソーム製剤を血液中に注入する場合の混合物としては、既に日本薬局方ブドウ糖が市販されていることから、注射用としてはブドウ糖が特に好ましい。

糖類の添加量としては、リボソーム製剤のリン脂質1重量部に対し、1~10重量部が好ましい。特に、注射用として用いるリボソーム製剤としては、糖類の添加量を調節して血液との等張性を保つようにすれば、注入時の浸透圧ショックを回避することができる。

本発明のリボソーム製剤及び糖類を分散させる水性媒体としては、水、生理食塩水、リン酸緩衝液等の緩衝液、又はこれらの混合液を用いることができ、使用量としてはリボソーム製剤のリン脂

ある。

#### (実施例)

以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

- (1) ステアリルアミンをリボソーム膜材として含有する80D保持リボソーム製剤分散液の調製

L- $\alpha$ -ジバルミトイルホスファテジルコリン(以下、L- $\alpha$ -DPPCと略す) 1.25g, ステアリルアミン130mg, コレステロール100mgを20mlのクロロホルムに溶解し、水流ポンプで減圧下、溶媒留去を行い、さらに完全に溶媒を除去するため、これをさらに、真空ポンプ(約数ミリトル)で、約1時間以上、減圧留去した。

次に約50℃のリン酸緩衝液(2.5 mM, pH 7.0)を約90ml加えて、振盪撹拌すること

質1重量部に対し、3~50重量部が好ましい。

80D保持リボソーム製剤及び糖類を分散させた水性媒体を凍結乾燥する方法は通常の方法でよく、例えば-20~-50℃で凍結させ、0.1 torr以下の減圧下において乾燥すればよい。この際、凍結乾燥時の賦形剤として一般に利用されるマンニトール、グリシン等をリボソーム製剤のリン脂質と同重量程度添加することも可能である。

このようにして得られた凍結乾燥80D保持リボソーム製剤の粉末を用時溶解する際の水性媒体は、凍結乾燥前にリボソーム製剤と糖類とを分散させた水性媒体と同一であることが好ましく、その使用量は、凍結乾燥したリボソーム製剤のリン脂質1重量部に対し、3~100重量部が好ましく、さらに5~10重量部が特に好ましい。

水性媒体中に再分散した80D保持リボソーム製剤は、そのまま使用に供してよいが、さらに遠心分離、ゲル濾過、限外濾過或いは透析等を行い、リボソームに保持されていない80Dを分離除去した後、種々の製剤として使用することも可能で

により、リボソーム懸濁液を得た。この懸濁液約10mlのリン酸緩衝液(2.5 mM, pH 7.0)に溶解させた牛赤血球由来80D溶液(80D 250mg含有)を添加し、混和撹拌し、この溶液を冷却しながら、40℃、30℃および20℃の各温度で超音波照射を数分間ずつ行なった。(ヒートシステム社製、1/2インチチップ超音波照射装置)次に、4~5℃で、1晩放置し、遠心分離(10000 rpm, 約12000g, 4~5℃, 約30分間)し、上澄をデカンテーションした後、得られたペレットを100mlの蒸留水に懸濁し、再度、超音波処理によって均一分散液とした。

- (2) リボソーム製剤の凍結乾燥

(1)で得られた分散液を分注し、これにブドウ糖(日本薬局方、注射液調製用第1製法)をそれぞれ0.14, 0.19, 0.28, 0.56 mmol/mlの濃度になるよう添加し、撹拌混合した。それぞれの混合液を5ml容量の凍結乾燥用バイアルに各1mlずつ分注し、凍結乾燥

表 1

保存期間	SOD保持率(%)
凍結乾燥前	100
凍結乾燥直後	88.3 ± 1.9
1ヶ月	89.5 ± 1.8
3ヶ月	90.2 ± 0.9
6ヶ月	85.5 ± 2.1
9ヶ月	90.1 ± 1.1
12ヶ月	88.6 ± 1.4

用ゴム栓を半打栓し、 $-40 \sim -45^{\circ}\text{C}$ に1時間保って凍結させた後、 $1.5 \times 10^{-4}\text{ torr}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$ (棚温)で16時間かけて真空凍結乾燥を行い、真空下で密栓することにより凍結乾燥品を得た。

(3) 凍結乾燥したリボソーム製剤の経時変化

(a)で得られた凍結乾燥品を $4^{\circ}\text{C}$ で保存し、一定期間毎にサンプリングし、用時溶解液として25 mMリン酸カリウム緩衝液(約pH 7.0)を25 ml添加し、かるく振盪して凍結乾燥品を再分散させ、SOD保持リボソーム製剤の分散液を得た。

この分散液のSOD活性測定をニトロブルーテトラゾリウム法(以下、NBT法と略す)によって調べ、これよりリボソーム製剤中のSOD保持率を次式に基づき算出した結果を表1に示す。

なお、表1中の保持率は、各保存期間を経過したサンプル3本の平均値を表わす。

SOD保持率=

$$\frac{\text{SOD全活性値} - \text{SOD上澄活性値}}{\text{SOD全活性値}} \times 100$$

SOD全活性値…分散液に、1 wt%トリトンX-100含有10 mMリン酸緩衝液を分散液の約10倍量添加してリボソームの破壊を行った後に、希釈し、NBT法により測定した値

SOD上澄活性値…分散液を $4^{\circ}\text{C}$ 、10000回転/分(約12000 G)で20分間遠

心分離した後の上澄液をNBT法により測定した値

1年間にわたる保存期間においてもSOD保持率は約85%を維持していた。

SOD保持率の測定とは別に、分散液に1 wt%トリトンX-100含有10 mMリン酸緩衝液を分散液の約10倍量添加、処理した後、Lowry法によりタンパク定量を行った。この測定値と先に求めたSOD全活性値からSOD比活性を求めた。SOD比活性は、凍結乾燥前又は直後の約3200 Units/mlを1年後もほぼ維持していた。

$4^{\circ}\text{C}$ で12ヶ月間保存した凍結乾燥品を(a)と同様な方法にて再分散させ、さらに30倍に蒸留水で希釈した。この分散液を用いて、動的光散乱光度計によるリボソーム粒子の粒度分布測定を行った結果を第2図に示す。

12ヶ月間の保存期間では、凍結乾燥前のリボソーム粒子の粒子径分布をほぼ維持していた。又、この分散液を光学顕微鏡、電子顕微

鏡によって観察した場合においても、分散液中にリボソーム粒子の凝集体の存在は認められなかった。

実施例 2.3

糖類として、ブドウ糖のかわりにショ糖、トレハロースを用いた他は、実施例1と同様にしてSOD保持リボソーム製剤の凍結乾燥を行った。凍結乾燥品の再溶解性は良好であり、SOD保持率、リボソーム粒子の粒子径分布や比活性にも凍結乾燥前後で大きな変化はなかった。又、保存安定性も良好であった。

(発明の効果)

本発明の方法によれば、再溶解時にSOD保持率を大きく低下させることなく、又、リボソーム粒子の粒子径分布を変化させることのないよう、リボソーム製剤を凍結乾燥することが可能となった。これは、ステアシルアミンを含有するリボソーム膜材及びSODから調製したリボソーム製剤

と糖類という特異な組合せによって達成されたもので、BOD保持率は凍結乾燥直後で約90%、12ヶ月保存した後でも約85%を維持している。

又、本発明の方法に従って調製したリボソーム製剤の凍結乾燥品は、再溶解時にすみやかに水性媒体に分散し、起泡やリボソーム粒子の凝集もない。

故に、本発明の方法は、長期保存安定性、安全性に優れ、又、製品として保管、輸送、品質の維持等が容易な医薬品等の製造方法として極めて利用価値が高い。

#### 4 図面の簡単な説明

第1図は、凍結乾燥前のBOD保持リボソーム製剤の粒子径分布を示す。

第2図は、本発明の凍結乾燥法によって凍結乾燥し、12ヶ月間保存した後、再分散させたBOD保持リボソーム製剤の粒子径分布を示す。

特許出願人 東ソー株式会社

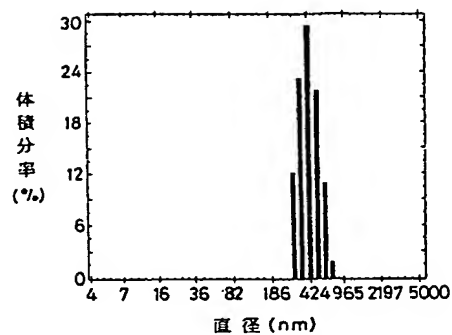


図 1

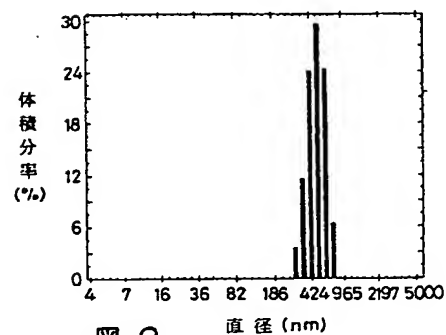


図 2

XP-002213307

AN - 1989-162879 [22]  
AP - JP19870264010 19871021  
CPY - TOYJ  
DC - B05  
DR - 0038-U 1065-U 1833-U  
FS - CPI  
IC - A61K9/10 ; A61K37/52  
MC - B04-B01B B04-B02C B04-D01 B05-B01P B07-A02 B10-A07 B12-M11F  
M1 - [01] M423 M431 M720 M782 M903 N104 Q620 R024 V753 V802 V811; 1704-X  
1724-X 1711-X 1714-X  
M2 - [02] B415 B701 B713 B720 B815 B831 H1 H181 H721 H722 J0 J012 J2 J272  
K0 L7 L722 M210 M211 M225 M231 M262 M273 M282 M283 M312 M313 M321 M332  
M342 M343 M383 M392 M411 M431 M510 M520 M530 M540 M620 M720 M782 M903  
M904 M910 N104 Q620 R024 V0 V771; R01833-M; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
- [03] H4 H405 H484 H8 J4 J471 K0 L8 L814 L821 L831 M280 M315 M321 M332  
M344 M349 M381 M391 M416 M431 M620 M720 M782 M903 M904 M910 N104 Q620  
R024; R00038-M; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
- [04] H1 H100 H181 M225 M231 M273 M281 M320 M416 M431 M620 M720 M782  
M903 M904 M910 N104 Q620 R024; R01065-M; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
- [05] F012 F013 F014 F015 F016 F019 F123 F199 H4 H405 H424 H482 H5 H521  
H8 K0 L8 L814 L819 L822 L831 M1 M126 M141 M280 M311 M322 M342 M373  
M392 M413 M431 M510 M522 M530 M540 M720 M782 M903 M904 N104 Q620 R024;  
R06064-M; 1704-X 1724-X 1711-X 1714-X  
M6 - [06] M903 Q620 R024 R112 R231 R315 R524 R527; 1704-X 1724-X 1711-X  
1714-X  
PA - (TOYJ) TOSOH CORP  
PN - JP1106829 A 19890424 DW198922 005pp  
PR - JP19870264010 19871021  
XA - C1989-072374  
XIC - A61K-009/10 ; A61K-037/52  
AB - J01106829 A superoxidedismutase (SOD)-holding liposome formulation  
contg. stearyl amine as a liposome film material and sugars of at least  
one of glucose, cane sugar, or trehalose are dispersed into an aq.  
medium. The mixt. is then frozen and dried.  
- SOD pref. comprises SOD derived from Escherichia coli, yeast, or  
animals, esp. that derived from a cow or human. The liposome film  
material comprises pref. natural phosphorolipid such as synthetic  
phosphorolipid, egg yolk, or soybean.  
- USE/ADVANTAGE - Formulation is used as an injection agent. Using  
stearyl amine-contg. film material, SOD-holding liposome formulation,  
and sugars together offers freeze drying of the liposome formulation  
without greatly decreasing the SOD holding rate or changing the grain  
dia. distribution of the liposome grain. The frozen and dried  
liposome formulation is promptly dispersed into a water medium,  
causing no bubble or aggregation of liposome grain. The liposome  
formulation has good long-term preservation stability, and safety. It  
is easily stored, transported and retains its quality, and useful for  
medicines mfr.. (Corrected entry)(0/0)  
AW - SOD  
AKW - SOD  
CN - R01833-M R00038-M R01065-M R06064-M